

CONSIDERAÇÕES SOBRE A MELIOIDOSE E O SEU AGENTE CAUSAL: *PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI*

A. F. PESTANA DE CASTRO (1), O. CAMPEDELLI Filho (1), W. GIORGI (1)
e C. A. SANTA ROSA (2)

RESUMO

Foram examinadas quatrocentas e cinquenta e cinco amostras de água de arrozais das regiões de Pindamonhangaba e Campinas (Estado de São Paulo, Brasil), com a finalidade de se tentar o isolamento de amostras de *Pseudomonas pseudomallei*. Apesar de nosso clima, no que diz respeito à temperatura e umidade, favorecer a ocorrência do microrganismo em nosso Estado, tomando-se como base as propriedades culturais e bioquímicas, nenhuma das amostras isoladas pôde ser classificada como *P. pseudomallei*.

INTRODUÇÃO

A melioidose, doença semelhante ao mormo e que acomete o homem e animais, tem sido descrita em diversos países, principalmente aqueles situados no Sudeste Asiático. Alguns casos ocorreram também na Tailândia, Austrália, Filipinas, Estados Unidos, Panamá e Equador^{2, 7}.

Tanto no homem como nos animais a moléstia é de caráter endêmico e, embora rara, é via de regra mortal. Caracteriza-se momentaneamente por quadros septicêmicos e nas formas subagudas ou crônicas pela formação de abscessos disseminados^{2, 9, 10}.

O agente causal da melioidose é uma bactéria Gram negativa denominada *Pseudomonas pseudomallei* que em um exame bacteriológico comum pode passar por um contaminante banal¹.

A maioria dos Autores que realizaram estudos sistemáticos sobre o germe, descrevem um tipo de colônia característico, obtido quando o microrganismo é cultivado em ágar simples com 3% de glicerol: as colônias inicialmente pequenas e lisas, em incubação prolongada tornam-se maiores (5 a 7 mm) e enrugadas (Fig. 1). Entretanto, na ausência de glicerol,

esta morfologia pode não aparecer, mantendo-se a forma lisa, mesmo após vários repiques.

Embora existam estudos taxonômicos bastante complexos para a classificação de espécies do gênero *Pseudomonas*, admite-se que o bacilo de Whitmore, como é também conhecido o agente da melioidose, seja um microrganismo que cresce em meio de Mac Conkey contendo 10 μ /ml de penicilina e 100 μ /ml de polimixina, em ágar glicerol (3%) contendo cristal violeta na concentração de 1:200.000, porém não cresce em meio de SS. Não produz indol, urease, nem H₂S (T.A.F.), liquefaz a gelatina, dá uma reação de oxidase positiva, reduz nitratos, não produz acetilmetilcarbinol e oxida a glicose, lactose, maltose, manitol e sacarose com a produção de ácido sem gás¹.

Certas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não produzem pigmentação característica mesmo quando semeadas em meios A e B de KING⁴ e, portanto, podem se confundir com as formas lisas de *P. pseudomallei*⁹. Para a diferenciação, recomenda-se a semeadura em meios como o caldo simples contendo 4% de cloreto de sódio, e em ágar soja e tripticase

(1) Médicos-Veterinários do Instituto Biológico de São Paulo e Bolsistas do CNPq

(2) Professor Assistente Doutor do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. — Departamento de Microbiologia e Imunologia



Fig. 1 — Cultura de *P. pseudomallei*. Cultivo em ágar-sangue incubado a 37°C durante 5 dias. Notar colônias enrugadas, características da espécie.

com 0,1% de cetil-trimetil brometo de amônio¹ além da sementeira em meio de SS, já citado.

A epidemiologia da melioidose tal como publicada nos livros-textos e artigos científicos, é extremamente confusa e contraditória, com vários aspectos que merecem ser comentados em detalhes.

Na espécie humana a primeira verificação deve-se a STANTON & FLETCHER¹³ que descreveram a doença como uma enfermidade adquirida de animais de laboratório. Posteriormente, os mesmos Autores observaram-na em cobaias e notaram que a moléstia ocorria em animais mantidos por diversos meses em gaiolas e que a sua transmissão experimental, poderia ser conseguida por inoculação da lavagem dos vegetais que eram fornecidos a estes animais como alimentação. Sugeriram então que os vegetais tinham sido contaminados por fezes de roedores silvestres, principalmente pelo fato de terem observado também, embora raramente, a infecção nestes animais¹³. Deste modo, esta idéia de que os roedores silvestres eram portadores de *P. pseudomallei* persistiu durante anos até recentemente, quando experiências realizadas por di-

versos Autores parecem comprovar que tal aspecto não corresponde à realidade.

Assim, CHAMBON³, utilizando-se de técnicas especiais de inoculação em cobaias jovens e sementeira em meio de Mac Conckey, conseguiu demonstrar de maneira inequívoca a presença da bactéria no solo e na água.

Anteriormente, MILLER & col.¹¹, haviam demonstrado que o hamster é o animal de laboratório mais suscetível à inoculação da *P. pseudomallei*.

É sabido que a leptospirose é também uma doença profissional, acometendo diversos trabalhadores entre os quais aqueles que trabalham em arrozais^{6, 14, 15}. Curiosamente, ELLISON & col.⁶, na Malásia, estavam levando a efeito uma pesquisa para isolamento de leptospirosas de campos de arroz, quando da inoculação de hamsters com água colhida nos arrozais além de leptospirosas, observaram inúmeros casos de morte nos animais inoculados e dos quais se isolava o agente causal da melioidose. Em consequência disto, estes últimos pesquisadores iniciaram uma pesquisa a fim de avaliar a eficiência dos hamsters no isolamento do microrganismo do solo e da água. De um total de 1.120 amostras de água e

1.078 de terra, conseguiram isolar 52 amostras de *P. pseudomallei*. Via de regra os animais morriam por volta do 4.º dia após a inoculação e de todos foi possível isolar, na maior parte das vezes, em cultura pura, o microorganismo.

STRAUSS & col.¹⁵ admitem que os casos fulminantes verificados tanto nos animais como no homem, representam apenas uma pequena parcela das infecções existentes. Inquéritos sorológicos realizados na Tailândia e no Vietnã comprovaram esta hipótese mostrando uma prevalência relativamente alta de anticorpos em grupos selecionados de pessoas normais. Nos animais domésticos também, além da ocorrência de reagentes, principalmente entre caprinos e ovinos, extensas lesões de melioidose têm sido encontradas em animais aparentemente normais. Todos estes achados indicam que a infecção ou doença assintomática pode ocorrer. Pesquisa bastante interessante e que serviu para elucidar alguns aspectos curiosos da bioecologia da melioidose, foi realizada também por STRAUSS & col.¹⁵. Estes Autores examinaram 1.592 amostras de soros da população da Malásia abrangendo diferentes grupos populacionais que tinham diferentes características de habitação e ocupação. Os exames sorológicos indicaram que os anticorpos contra a *P. pseudomallei* se encontravam bastante distribuídos na população. Verificaram ainda que existia uma estreita in-

fluência do tipo de vegetação e a ocorrência na população de anticorpos em títulos significantes. Assim, a percentagem de títulos hemaglutinantes em indivíduos que trabalhavam em arrozais variou de 15,4% a 22,9% ao passo que para as outras ocupações relacionadas com outros tipos de vegetação a média de reagentes foi de 3%.

REDFEARN & col.¹² em estudo pormenorizado da distribuição da *P. pseudomallei* verificaram que todos os lugares, onde haviam sido descritos casos de melioidose, estavam situados entre 20º de latitude Norte e 20º latitude Sul (Fig. 2). Contudo a infecção já foi descrita fora desta região como, por exemplo, nos Estados Unidos².

LAWS & HALL¹⁰ que observaram casos de melioidose na Austrália, fizeram também observações relativas às condições climáticas daquela região, que durante os meses de janeiro a março são bastante semelhantes às nossas no que diz respeito à temperatura média e índice pluviométrico.

Recentemente, por ocasião da visita ao Brasil, do Dr. A. D. Alexander, do "Walter Reed Army Medical Center", especialista em leptospirose da W.H.O. e também estudioso da melioidose tivemos a nossa atenção despertada para a possibilidade da ocorrência do agente da melioidose entre nós. Aumentou a nossa curiosidade a proximidade de nosso Estado dos 20º latitude Sul (Fig. 2), as nossas

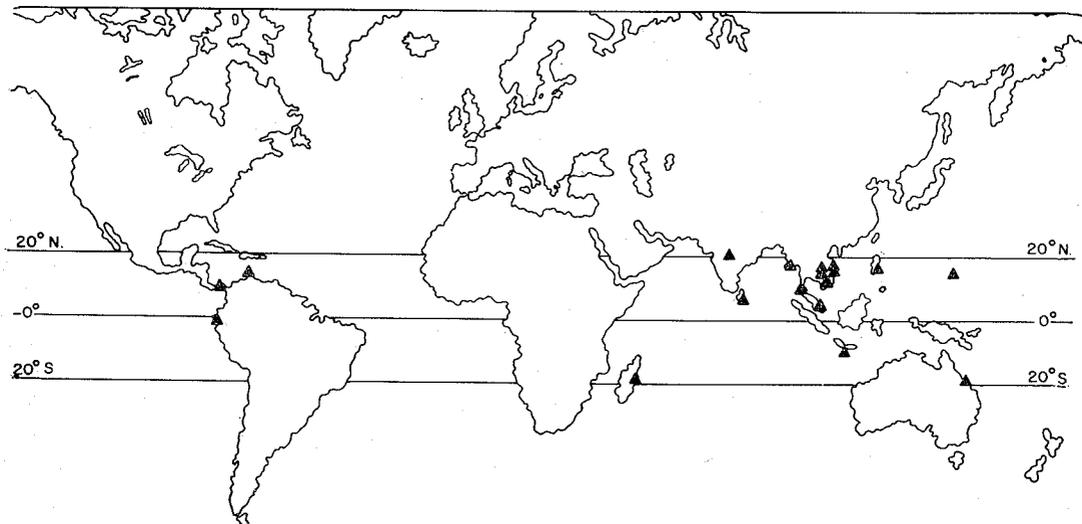


Fig. 2 — Localidades onde ocorreram casos de melioidose. Cada triângulo indica área onde pelo menos um caso diagnosticado bacteriologicamente tenha sido descrito¹².

condições climáticas, bem como a existência no Estado de São Paulo, de plantações de arroz submetidas ao processo de irrigação artificial. Saliente-se entretanto, que até o presente momento, nenhum caso foi descrito entre nós, quer na espécie humana, quer entre os animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante os meses de janeiro, fevereiro e março de 1972, foram colhidas, de arrozais das regiões de Pindamonhangaba e Campinas, 455 amostras de água em diferentes áreas das culturas em questão (*). As amostras foram coletadas em tubos estéreis 18 x 18 em quantidade aproximada de 30 ml e enviadas ao laboratório para exame.

Preparo de soro hiperimune

Antígenos (Escala de Mac Farland, tubo n.º 3) mortos pelo calor, preparados com a amostra 7919 de *P. pseudomallei* (**), foram inoculados por via intravenosa em coelhos adultos para a obtenção de soro hiperimune, uma vez que colônias suspeitas da bactéria podem ser submetidas a triagem através da aglutinação em lâmina^{1, 2}. Os animais foram inoculados em dias alternados com doses crescentes de 0,5 a 8 ml durante 15 dias e sangrados 6 dias após a última inoculação. O soro obtido foi capaz de aglutinar em lâmina antígeno padrão concentrado (Escala de Mac Farland, tubo n.º 10) até um título de 1:30 quando colocados em quantidades idênticas soro e antígeno.

Todas as amostras de água foram examinadas por diferentes técnicas seletivas descritas^{1, 3, 6, 10}, uma vez que a natureza do material altamente contaminado dificulta o isolamento do microrganismo. As amostras de água, não concentradas, eram remetidas ao laboratório e semeadas diretamente com uma alça de platina em placas contendo ágar nutriente com penicilina e polimixina¹.

Cerca de 15 ml de cada amostra de água era também semeada em 15 ml de meio de Mac Conkey duplamente concentrado, contendo cristal-violeta na proporção de 1:100.000 além de penicilina e polimixina nas concentrações de 20 µ/ml e 200 µ/ml respectivamente, de modo que, após a adição da água a ser examinada, a concentração de cristal violeta passasse a ser 1:200.000 e a de antibióticos 10 a 100 µ/ml respectivamente.

Após 72 horas de incubação a 37°C o crescimento obtido neste meio era semeado em ágar-glicerol (3%), com penicilina, polimixina e cristal violeta na proporção 1:200.000¹. O propósito da adição de glicerol era o de facilitar o aparecimento das colônias rugosas características da espécie bacteriana pesquisada. As placas eram então incubadas a 37°C durante pelo menos cinco dias.

Cerca de 1 ml de cada grupo de cinco culturas em meio de Mac Conkey líquido eram misturadas em um tubo estéril e desta mistura 1 ml era inoculado por via subcutânea em hamsters jovens. Todo animal morto era necropsiado e sangue do coração colhido aseticamente era semeado em meio de ágar-glicerol com penicilina, polimixina e cristal violeta procedendo-se, em seguida, a incubação das placas, por período mais prolongado, conforme já foi descrito.

Amostras de água concentradas

Os restantes 15 ml de cada amostra de água eram colocados em um balão estéril até totalizar um volume aproximado de 1.000 ml sendo em seguida tratados com uma solução de alumen de potássio de acordo com o método recomendado por LAWS & HALL¹⁰. Cerca de 50 ml do precipitado era então semeado em 50 ml de meio líquido de Mac Conkey duplamente concentrado adicionado de cristal violeta e antibióticos.

Foram obtidas 9 alíquotas assim tratadas que após incubação foram inoculadas individualmente em hamsters e semeadas em ágar-glicerol com antibióticos e cristal violeta.

(*) Amostras gentilmente coletadas pela Dra. Regina E. de Melo Amaral, Chefe da Secção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo

(**) Amostra enviada pelo Dr. A. D. Alexander do Walter Reed Army Medical Center, Washington, D.C. — USA

Identificação das colônias suspeitas

Todas as colônias suspeitas eram submetidas a prova de oxidase⁴ e em seguida se positivas eram repicadas para tubos com ágar nutriente para testes sorológicos, de aglutinação em lâmina, conforme recomendam vários Autores^{1, 2}.

Todas as culturas selecionadas com base em ambos os testes eram examinadas bacterioscopicamente e em seguida bioquimicamente de acordo com a metodologia preconizada por HUGH³ a saber: teste de OF, utilização do citrato de Simmons, redução de nitratos, crescimento a 42°C, crescimento em meio mínimo contendo ácido Beta-hidroxibutírico e oxidação do gluconato. Além destes foram realizados os seguintes testes recomendados por ALEXANDER¹ e COWAN & STEEL⁴: produção de indol, urease e H₂S (em T.A.F.), hidrólise da gelatina, verificação de crescimento em meio de SS e em caldo simples contendo 4% de cloreto de sódio, produção de acetil-metil carbinol e oxidação da glicose, lactose, maltose, manitol e sacarose. Foram também utilizados os meios A e B de King específicos para facilitar a produção de pigmentos⁴.

RESULTADOS

De quase todos os tubos, com meio de Mac Conckey duplamente concentrado e adicionado de penicilina, polimixina e cristal-violeta isolaram-se nos meios sólidos por material examinado em média 2 a 3 tipos diferentes de microrganismos.

Por outro lado a inoculação da cultura líquida em hamsters permitiria favorecer o isolamento da *P. pseudomallei*, caso a contaminação resistente aos impedientes acrescentados mascarasse o aparecimento de algumas colônias da bactéria procurada. Não se adotou exclusivamente este último método porque se encontram na literatura citações da ocorrência de algumas amostras de *P. pseudomallei* pouco virulentas⁵. A semeadura direta fazia-se ainda necessária devido à possibilidade de existência, na cultura em meio de Mac Conckey, de outras bactérias mais virulentas para os animais de experimentação, vindo a matá-los antes do período em que nor-

malmente ocorre a morte de animais inoculados com amostras de *P. pseudomallei*.

Tanto por semeadura direta como por isolamento através da inoculação em hamsters foram selecionadas 30 culturas que no exame preliminar mostraram-se como suspeitas, isto é, eram oxidase positivas e aglutinavam ligeira ou fortemente como o soro hiperimune. Quinze destas amostras, apesar de apresentarem por vezes odor telúrico citado como característico da espécie *P. pseudomallei*, foram em seguida eliminadas em virtude de se comportarem como F na prova de oxidação-fermentação e foram classificadas como provavelmente, pertencentes ao gênero *Aeromonas*. Não foram realizados outros testes para a confirmação do gênero e determinação de espécie destas amostras.

Dez outras amostras produziram alcali em tubo aberto na prova de OF e foram classificadas como *Pseudomonas diminuta* por apresentarem o seguinte comportamento bioquímico: cresceram em citrato de Simmons, reduziram nitratos, não oxidaram o gluconato de potássio nem produziram acetil-metil carbinol, cresceram as expensas de ácido B-hidroxibutírico, em meio de Mac Conckey, SS e em caldo simples com 4% de cloreto de sódio. Nenhuma das amostras produziu H₂S (T.A.F.), urease ou liquefaz a gelatina. As reações de oxidação da glicose, lactose, maltose, manitol e sacarose foram negativas após quinze dias de observação. Não foi observada produção de pigmentos em nenhuma das amostras mesmo quando semeadas em meios A e B de King.

As restantes cinco amostras apresentaram comportamento bioquímico compatível com a espécie *Pseudomonas alcaligenes*. Diferenciaram-se da *P. diminuta* porque não utilizaram o citrato de Simmons e por liquefazem a gelatina, comportando-se de modo semelhante nos demais testes.

Nenhuma das amostras isoladas apresentou resultados que permitissem identificá-las como sendo *P. pseudomallei*.

DISCUSSÃO

Os processos utilizados no presente trabalho para se tentar isolar a *P. pseudomallei* de água de arrozais, em termos de eficiência, po-

Ovos de *Schistosoma mansoni* não ficaram visualizados em três pesquisas parasitológicas executadas com as fezes, mediante utilização do método quantitativo de Kato; porém, à quarta procura, 20 por grama, viáveis, puderam ser contados. Em fragmentos retais, obtidos por biopsias, eles também eram perceptíveis, exibindo condições de viabilidade.

A cifra de eosinófilos (6% ou 450 por mm³) ao hemograma afigurou-se a única constatação anormal no que concerne aos resultados de várias apreciações subsidiárias levadas a efeito e representadas pelas reações sorológicas para o diagnóstico da sífilis, pela análise rotineira de urina e pelas dosagens de bilirrubina, de colesterol, de fosfatase alcalina, de mucoproteína, de proteínas e frações e de transaminase glutâmico-pirúvica no soro, como ainda pela cistoscopia; o sedimento urinário não continha ovos de helmintos. A eletroforese das proteínas séricas indicou muito discreta diminuição da taxa de albumina e, respectivamente, aumento pouco sensível e moderado dos teores de globulinas alfa-1 e beta, sem modificação das cifras do componente gama. A transaminasemia glutâmico-oxalacética, de 50 unidades por 100 ml, suplantou um pouco os valores aceitos como compatíveis com normalidade. À urografia excretora, pequena área de calcificação prostática pôde ser notada e, para o significado e gênese do fato, não encontramos explicação satisfatória e definitiva.

Quarenta e quatro dias após o primeiro, já mencionado, novo espermograma mostrou sêmen leitoso, com os mesmos grãos, compostos então de espermatozoides, leucócitos e ovos não viáveis de *Schistosoma mansoni*.

Para terapêutica específica usamos o "Hy-canthone". A dose escolhida, de 3 mg/kg, foi administrada pela via intramuscular e conduziu à cura parasitológica, determinada por seis pesquisas nas fezes, praticadas mensalmente, através do processo de Kato; ovos também não eram perceptíveis no esperma um semestre depois da injeção do composto citado.

É preciso deixar patente que a hemospermia, macroscopicamente caracterizada, teve a duração limitada e transitória de mais ou menos vinte dias e essa evolução independeu da adoção de qualquer conduta terapêutica.

DISCUSSÃO

Os fatos relatados permitem, acreditamos, consignar os comentários a seguir enumerados.

1) A hemospermia não faz parte, comumente, do conjunto de sinais e sintomas atribuíveis à esquistossomíase, pelo menos ao serem valorizados os informes disponíveis. As publicações sob a responsabilidade de ARMSBRUST² e de AREÁN¹, que contêm casuísticas de elevado porte, atestam, além disso, a relativa raridade de comprometimentos dos setores genital e urinário, no decurso da helmintíase em questão.

2) A duração do sinal clínico em foco, que conduziu ao diagnóstico da verminose, foi pouco pronunciada e não dependeu da instituição de tratamento específico.

3) Frisamos que, sob o ponto de vista semiológico, não ficaram percebidas anormalidades concernentes às esferas genital e urinária. Explicação aceitável e satisfatória para a calcificação prostática notada não nos ocorreu.

4) O processo quantitativo de Kato indicou positividade do exame das fezes, com 20 ovos de *Schistosoma mansoni* por grama, que consubstancia parasitismo não exageradamente acentuado, desde que mensurado dessa maneira. É necessário destacar também que era a intestinal a modalidade clínica da doença.

5) Devemos admitir, para justificar o sucedido, a participação de vermes adultos ovipondo, a par de localizações nos plexos venosos pudendos e migrações por anastomoses com o sistema da veia mesentérica inferior.

6) Ao relatar a observação que realizamos, apenas tivemos a intenção de registrar manifestação não usual no âmbito da esquistossomíase. Paralelamente, sugerimos a execução de estudos apropriados e sistematizados, tendentes a estabelecer a freqüência de acordo com a qual têm lugar a hemospermia em particular e outros comprometimentos, traduzidos por expressões clínicas e ligados aos aparelhos genital e urinário em geral, no que diz respeito a essa verminose.

S U M M A R Y

Presence of blood in sperm due to mansoni schistosomiasis: Case report

The Authors present a case of mansoni schistosomiasis, intestinal form, in which a transient presence of blood in sperm has occurred. The diagnosis of the worm infestation was established by the finding of *Schistosoma mansoni* eggs in the sperm during the examination of this latter for the blood in there. The worm disease was not suspected previously.

Due to the uncommon presence of blood in sperm of patients with schistosomiasis, in the Authors' judgement it was worth registering such an occurrence. It is quite important to report the uncommon organic localizations of that disease not only to establish the frequency with which they do occur but also for practical purposes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AREÁN, V. M. — Lesions caused by *Schistosoma mansoni* in the genitourinary tract of men. *Amer. J. Clin. Path.* 26:1010-1021, 1956.
2. ARMSBRUST, A. F. — Lesões geniturinárias na esquistossome mansoni. *Hospital (Rio)* 38:177-210, 1950.
3. CAMPOS, R.; CIMERMAN, B.; FIOCCHI, C. & INÁCIO, W. — Nota sobre o encontro de ovos de *S. mansoni* no esperma. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 5:315-317, 1971.
4. MADDEN, F. C. — Two rare manifestations of bilharziasis. *Lancet* 2:754-755, 1911.
5. MAKAR, N. — Some surgical aspects of bilharziasis. *X Cong. Soc. Intern. Chirurg. (Cairo)* 3:477-524, 1935.
6. PINTO, C. & ALMEIDA, A. F. — Formas clínicas da esquistossomiase mansoni no Brasil. *Rev. Brasil. Med.* 2:636-652, 1945.

Recebido para publicação em 2/6/1972.